绿盲蝽酯酶基因 *AlucEST*1 的克隆及表达谱分析

沈 忱[1,2], 谷少华[2], 武红珍[1,2], 韩 榕[1], 张永军[2,*], 郭予元[2]

(1. 山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004;
2. 中国农业科学研究院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 昆虫体内的气味降解酶(odorant degrading enzymes, ODEs)能够降解气味分子, 使嗅觉受体免受持续的刺激。酯酶作为气味降解酶类的一种, 在昆虫嗅觉行为过程中发挥重要作用。本研究利用 RACE 技术克隆了一个新的绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 酯酶基因 *AlucEST*1 (GenBank 登录号: JQ715614)。序列分析结果表明, 该基因全长 1 810 bp, 开放阅读框为 1 713 bp, 编码 571 个氨基酸。N-末端疏水区包含由起始位置开始的一段 17 个氨基酸的信号肽。通过半定量 RT-PCR 和 Real-time qPCR 技术解析该酯酶基因在不同组织的表达谱。结果发现, 该酯酶基因在绿盲蝽的触角、头、胸、腹、足、翅等部位中均有表达。其中, *AlucEST*1 在胸、腹部中表达量最高, 在触角中也大量表达。据此推测该基因在气味分子的降解中起重要作用, 同时也参与绿盲蝽体内的多种代谢调控。

关键词: 绿盲蝽; 气味降解酶; 酯酶; 基因克隆; 表达谱
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2012)09-1014-08

Cloning and expression profiling of the esterase gene *AlucEST*1 in the green plant bug, *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

SHEN Chen[1,2], GU Shao-Hua[2], WU Hong-Zhen[1,2], HAN Rong[1], ZHANG Yong-Jun[2,*], GUO Yu-Yuan[2] (1. College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Odorant degrading enzymes (ODEs) can degrade the excess odor molecules so as to prevent olfactory receptors from the sustained stimulation. Esterase is a kind of odorant degrading enzyme, and plays an important role in the process of insect olfactory behavior. In this study, a novel putative ODE gene *AlucEST*1 (GenBank accession number: JQ715614) from the green plant bug, *Apolygus lucorum* was cloned by using rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technique. Sequence analysis showed that *AlucEST*1 is 1 810 bp in length with the open reading frame of 1 713 bp, and encodes 571 amino acids. The N-terminal hydrophobic region contains a 17 amino acid signal peptide. Semi-quantitative RT-PCR and Real-time qPCR were conducted to explore the *AlucEST*1 expression in different tissues of *A. lucorum*. The results showed that *AlucEST*1 was expressed in various tissues including antennae, head, thorax, abdomen, legs and wings. *AlucEST*1 had the highest expression level in thorax and abdomen, and was also abundantly expressed in the antennae. It is so inferred that the gene plays an important role in the degradation of odor molecules and is also involved in a variety of metabolic regulation in *A. lucorum*.

Key words: *Lygus lucorum*; odorant degrading enzyme (ODE); esterase; gene cloning; expression profile

盲蝽象(Heteroptera: Miridae)属半翅目(Hemiptera)盲蝽科(Miridae)。是我国棉花生产上一类重要害虫, 每年在全世界范围内都对棉花产量造成巨大的损失。1997 年, 我国开始商业化种植 Bt 棉花, 到 2008 年, 美国、中国、印度、澳大利亚、阿根廷、巴西、南非、墨西哥、哥伦比亚等国家种植 Bt 抗虫棉花已超过 1 500 万公顷。种植 Bt 棉花有效控制了棉铃虫等主要鳞翅目害虫的危害, 但棉

基金项目: 国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2012CB114104); 国家自然科学基金项目(31071694, 31272048)
作者简介: 沈忱, 女, 1987 年 8 月生, 山西大同人, 硕士研究生, 研究方向为分子化学生态学, E-mail: shenchen09@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yjzhang@ippcaas.cn
收稿日期 Received: 2012-04-16; 接受日期 Accepted: 2012-09-07

盲蝽种群发生数量剧增，由棉花的次要害虫上升为主要害虫之一。我国几大棉区已经出现盲蝽危害加重的趋势，而其中绿盲蝽 *Lygus lucorum* 已成为我国黄河流域、长江流域棉区危害最严重的优势种群（Wu，2007；Lu *et al*.，2007；陆宴辉等，2008）。目前防治盲蝽主要靠化学农药，这不仅容易导致盲蝽抗药性的产生，而且对环境造成了巨大的污染和破坏，这就使得开发绿色环境友好型防治绿盲蝽的新方法和新技术显得尤为重要。当前通过调控绿盲蝽的嗅觉行为对其进行有效防治无疑是一个很好的选择。

酯酶作为气味降解酶类的一种，在昆虫嗅觉行为过程中发挥重要作用。昆虫体内的气味降解酶（odorant degrading enzymes，ODEs）能够降解气味分子，使嗅觉受体免受持续的刺激并保证完成嗅觉识别过程。Vogt 和 Riddiford（1981）首先报道在多音天蚕蛾 *Antheraea polyphemus* 触角中存在一种酯酶，这种酯酶能够降解多音天蚕蛾性外激素中的乙酸酯组分，并且在雄蛾触角中特异性表达。Ishida 和 Leal（2002）从多音天蚕蛾中克隆了一个外皮酯酶，分布于触角和足中并参与气味降解。Maïbèche-Coisne 等（2004）从甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 中克隆出一个酯酶基因，通过蛋白质预测其具有羧酸酯酶的结构特征，具有催化三联体，并且特异性地存在于雌性和雄性的触角中，也在雄性的喙中特异性表达，推测其在气味降解中起作用。Vogt（2005）发现部分具有水解活性的 α-酯酶和 β-酯酶能降解性信息素和其他外源气味分子，并发现基因在昆虫触角中表达。随后 Ishida 和 Leal（2005）从分子水平上鉴定了该酯酶，并发现此酶能以比之前预期更快的速度使信息素失活。Merlin 等（2007）报道海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 体内的两种酯酶参与醋酸盐化合物作为信息素化合物的下降过程，并且利用 Northern-blot 和原位杂交的手段进行了精确定位。Durand 等（2010b）首次在海灰翅夜蛾成虫触角中发现并且鉴定了羧酸酯酶 SlCXE10 对植物绿叶气味物质具有代谢作用，并对触角中表达的羧酸酯酶功能进行了初步的鉴定。在昆虫的抗药性方面，对于酯酶的研究也比较深入。Wirth 等（1990）在对有机磷杀虫剂产生抗性的五带淡色库蚊 *Culex quinquefasciatus* 研究中发现，昆虫对杀虫剂产生抗性时羧酸酯酶基因的表达过量，并且羧酸酯酶的活力越高抗性也越强。2004 年，从美国牧草盲蝽 *Lygus pratensis* 中克隆到一个酯酶基因，该基因在对杀虫剂产生抗药性的种群中表达水平更高（Zhu *et al*.，2004）。羧酸酯酶是昆虫体内的重要解毒酶系，它们在昆虫的抗药性过程中扮演了重要角色，而且能够使昆虫免受来自植物次生物质的毒害（张霞等，2008）。

在前期构建绿盲蝽触角 cDNA 文库的基础上，针对其中一条酯酶基因片段采用 RACE 技术克隆了一个新的绿盲蝽酯酶基因 *AlucEST*1（GenBank 登录号：JQ715614），并通过 RT-PCR 半定量和 Real-time qPCR 技术解析了该酯酶基因在不同组织的表达谱，以期为明确酯酶基因 *AlucEST*1 在绿盲蝽嗅觉通讯过程中的功能提供依据。

1　材料和方法

1.1　试供昆虫

绿盲蝽采集于中国农业科学院植物保护研究所廊坊科研中试基地（河北廊坊）。室内饲养方法参照 Lu 等（2007），采用新鲜的甜玉米在保鲜盒内饲喂绿盲蝽，饲养环境温度 25℃ ~28℃，相对湿度 60%~70%，光周期 16L∶8D。

1.2　主要试剂

总 RNA 提取使用 Trizol、DNase I、SuperScript Ⅲ 第一链 cDNA 合成系统购于 Invitrogen。SMARTer™ RACE 试剂盒、Premix Ex Taq、DNA Marker DL2000、胶回收试剂盒均购于 TaKaRa。其余均为国产或进口分析纯试剂。

1.3　RNA 的提取

取绿盲蝽 2 日龄成虫 10 头，用液氮研磨后，采用 Trizol 试剂盒进行总 RNA 提取，所有操作均按照试剂盒说明书执行。将获得的 RNA 溶于 50 μL RNA-free DEPC 水中，置于 -80℃保存备用。

1.4　cDNA 的合成

分别将 2 μL 总 RNA，1 μL Oligo（dT）$_{20}$，1 μL dNTPs Mix 和 6 μL DEPC-H_2O 混匀于 PCR 管中，稍适离心，65℃水浴 5 min，然后冰上终止反应 2 min，再向 PCR 管中依次加入 2 μL 10 × RT Buffer，4 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，2 μL 0.1 mol/L DTT，1 μL RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor 和 1 μL SuperScript Reverse Transcriptase，稍适离心，充分混匀，50℃温浴 50 min 后 85℃温浴 5 min，随后冰上终止反应 2 min 稍适离心，加 1 μL RNase H 于 37℃温浴 20 min，-20℃保存或直接用于下一步 PCR 扩增。

1.5 RACE 扩增

分别取 2.75 μL RNA 和 1.0 μL 5′-CDS Primer A 到一支离心管内，另取 3.75 μL RNA 和 1.0 μL 3′-CDS Primer A 加入到另一支离心管中。两支离心管置于 72℃温浴 3 min，42℃温浴 2 min 后14 000 r/min 离心 10 s。仅向 5′ ready cDNA 中加入 1 μL SMARTer IIA oligo。然后向两管中都加入事先配好的 2 μL 5 × First-Strand Buffer，1 μL DTT（20 mmol/L）、1 μL dNTPs Mix（10 mmol/L）、0.25 μL RNase Inhibitor（40 U/μL）、1 μL SMARTScribe™ Reverse Transcriptase（100 U）混合液并充分混匀，混合后的总体积为 10 μL。42℃反应 90 min，然后 72℃反应 10 min。随后用 Tricine-EDTA 稀释反应产物。将制备好的 5′-RACE cDNA 和 3′-RACE cDNA 放入 −20℃的冰箱保存备用。采用 Primer Premier 5.0 软件，根据已知的序列分别设计 5′端特异性引物 GSP1（5′-GAGTCCCATCCGGGAGATCTGCAGG-3′）和 3′端特异性引物 GSP2（5′-CCACGTTCTGGAGTACAATGACGTCATGG-3′）。

以 5′RACEready cDNA 和 3′RACEready cDNA 为模板，以基因特异性引物和 Universal Primer A Mix（UPM）为上下游引物，分别进行 5′RACE 和 3′RACE 的扩增。PCR 反应体系为 PCR-Grade Water 34.5 μL，10 × Advantage 2 PCR Buffer 5 μL，dNTPs Mix 1 μL，50 × Advantage 2 Polymerase Mix 1 μL，5′-RACE-Ready cDNA 2.5 μL，UPM（10 ×）5 μL，GSP（10 μmol/L）1 μL。PCR 反应条件：95℃ 2 min，94℃ 30 s，72℃ 3 min 计 5 个循环；94℃ 30 s，70℃ 30 s，72℃ 3 min 计 5 个循环；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 3 min 共计 30 个循环。扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR 扩增产物利用 Axygen 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收，回收的 DNA 片段与 pGEM-Teasy 载体连接（按试剂盒说明操作），进行 TA 克隆。重组克隆载体 pGEM/EST 转化到 DH5α 感受态细胞中，然后涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 平板上，37℃倒置培养 15 h 经蓝白斑筛选后，挑取 7 个阳性克隆在 LB 液体中（含 Amp）培养过夜。

1.6 序列分析

将验证正确的重组质粒送华大公司进行测序，利用生物信息学方法对测序结果进行分析。序列相似性搜索使用 BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）工具；核酸序列的基本理化性状分析预测软件用（http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool）；NCBI 的 GenBank 序列提交软件使用 SEQUIN（4.50）；序列比对软件使用 DNAMAN；进化树构建使用 MEGA 4.0 软件。

1.7 半定量 RT-PCR 检测绿盲蝽不同组织中 *EST*1 基因表达

利用 Trizol 分别提取绿盲蝽不同组织（触角、头、胸、腹、足、翅）总 RNA，除去残留的基因组 DNA。按照说明书采用 Invitrogen 的 SuperScript 逆转录合成系统合成第一链 cDNA。3 次生物学重复。在半定量检测 *AlucEST*1 基因表达中，以 200 ng 的 cDNA 为模板，加入 10 × ExTaq Buffer（含 Mg^{2+}）5 μL，基因正反向引物各 1 μL：

$AlucEST1\text{-}F_1$：

5′-ATTCAACCAAGCGTTGCACGAGA-3′；

$AlucEST1\text{-}R_1$：

5′-AGTCTGGGAGGCCTGATTTCACTGT-3′。

内参基因正向和反向引物各 1 μL：

$GADPH\text{-}F_1$：

5′-ATGTCCAAAATCGGGATCAATGG-3′；

$GADPH\text{-}R_1$：

5′-TCAGTGTACCCCAAGATTCCCTTG-3′；

$Tub\text{-}F_1$：

5′-ATGGAACGTCTCTCGGTGGATT-3′；

$Tub\text{-}R_1$：

5′-TACATCAAGTCGATTATGTTCAGTCTTG-3′。

1.8 Real-time qPCR 定量检测绿盲蝽不同组织中 *EST*1 基因表达

用于 Real-time qPCR 的 cDNA 模板同 RT-PCR。采用 SYBR Green 相对定量法对绿盲蝽 *EST*1 在不同组织中的表达量进行测定。内参基因为绿盲蝽 GADPH 基因和 Tub 基因。根据测序结果用 Primer Express 3.0（Applied Biosystems，Carlsbad，CA）软件设计引物，序列如下：

$AlucEST1\text{-}F_2$：

5′-CCAAGAAACCCCGTGAGAAA-3′；

$AlucEST1\text{-}R_2$：

5′-TGGTCTGTCTCTCAAGCACTCAA-3′；

$GADPH\text{-}F_2$：

5′-CGAGTTCCTGTCCCTAATGTTTC-3′；

GADPH-R_2：5′-GCCTCCTTCACCTTCTGCTT-3′；

$Tub\text{-}F_2$：5′-GCGACCAACATACACCAACCT-3′；

$Tub\text{-}R_2$：5′-CCACATTCAGGGCACCATC-3′。

上述设计好的引物在华大基因合成。起始模板为上述合成好的不同组织的 cDNA，模板量均为

200 ng，Real-time qPCR 采用25 μL 反应体系，包括 Premix Ex Taq 10 μL（TaKaRa），正反向引物（10 mol /L）各0.5 μL，Reference DyeⅡ 0.5 μL，模板 cDNA 1 μL，无菌水7.5 μL 反应条件为：94℃预变性10 s；95℃ 20 s，60℃ 34 s，40 个循环。空白对照模板以水代替。cDNA 所有样品均重复 3 次。Real-time PCR 仪为 ABI Prism 7500 Fast Detection System（Applied Biosystems）反应结束后采集目标基因的 Ct 值和两个内参基因的 Ct 平均值，利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法（Livak and Schmittgen，2001）计算目标基因在不同组织表达量差异。不同组织间以目标基因在触角中的表达量为标准参量（calibrator）。

2　结果与分析

2.1　绿盲蝽 EST1 基因序列的克隆及分析

前期已构建的绿盲蝽触角 cDNA 文库中鉴定到一条酯酶基因序列片段长 1 100 bp，通过 5′RACE PCR，以 UPM 为上游引物 GSP1 为下游引物首先克隆出酯酶基因的 5′端。随后通过 3′RACE 以 GSP2 为上游引物，UPM 为下游引物克隆出酯酶基因的 3′端。序列拼接后得到该基因全长为 1 810 bp，开放阅读框为 1 713 bp。推导编码氨基酸序列长度为 571。预测蛋白分子量为分子量 63.44 kDa，等电点为 5.99。预测 N-末端疏水区包含由起始位置开始的一段 17 个氨基酸的信号肽。此基因命名为 *AlucEST*1（图 1），GenBank 登录号为 JQ715614。

2.2　酯酶基因亲缘关系分析

利用 NCBI 网站 BLAST 与绿盲蝽酯酶基因 *AlucEST*1 亲缘关系较近的酯酶基因，以及已发表的与气味降解作用相关的酶类基因序列。将 *AlucEST*1 与其他已发表的酯酶基因及和气味降解有关的基因进行比对，应用 MEGA5.0 对包括绿盲蝽酯酶基因在内的 20 种不同种类的昆虫相关酯酶进行系统发育进化树的构建（图 2）。

2.3　*AlucEST*1 基因转录表达谱分析

利用半定量 RT-PCR 技术分析绿盲蝽酯酶基因在成虫不同组织之间的表达差异，结果表明，*AlucEST*1 基因在成虫不同组织中均有表达（图 3）。

为了验证 RT-PCR 的结果，同时更加精确地解析绿盲蝽 *AlucEST*1 的时空表达。本研究利用 Real-time qPCR 方法对 *AlucEST*1 在成虫不同组织的表达量进行了定量测定。结果表明，该基因在绿盲蝽成虫的各个部位中均有表达，且主要在触角、胸部和腹部中表达。这和半定量结果一致。以目的基因在触角中的表达量为标准参量，*AlucEST*1 基因在触角、头、胸、腹、足、翅中的表达水平分别占整体表达量的16.5%，9%，34%，20.5%，12%和8%（图 4）。

3　讨论

本研究首次以绿盲蝽为研究对象，通过筛选绿盲蝽触角 cDNA 文库并结合 SMARTer™ RACE 技术首次克隆了一个绿盲蝽酯酶基因 *AlucEST*1，得到基因全长序列。序列分析发现 *AlucEST*1 属于酯酶基因大家族，进化树分析表明，*AlucEST*1 与同属于半翅目的美国牧草盲蝽酯酶基因亲缘关系最近，这表明这两个基因可能来源于共同的祖先并且可能具有相似的功能。美国牧草盲蝽酯酶基因与昆虫抗药性具有一定的相关性。研究发现抗马拉硫磷的牧草盲蝽的酯酶活性更强（Zhu *et al.*，2004）。另外，与其同处于一个大分支下的还有斜纹夜蛾触角酯酶、多音天蚕蛾外皮酯酶、海灰翅夜蛾羧酸酯酶、甘蓝夜蛾触角酯酶等已知与气味降解功能相关的基因（Durand *et al.*，2010a）。*AlucEST*1 与这些基因同源性较高，可能具有与气味降解相关的作用。由此推测该基因可能参与包括抗药性及气味识别相关的多种行为过程。

大量的研究表明，昆虫酯酶的功能主要有两方面：一方面参与介导化学信号的失活、气味的降解作用（Vogt and Riddiford，1981），另一方面重要的作用就是与昆虫对杀虫剂的抗性有关的作用（Zhu *et al.*，2004）。昆虫的嗅觉反应包括一系列连续的反应：包括气味分子的结合，气味分子在感器淋巴液内的运输，气味分子与受体的结合，信号的转化，传导与终止（王桂荣等，2004）。其中，信号的终止在嗅觉反应中起着非常重要的作用，不仅避免了嗅觉器官受到连续的化学刺激同时还减小了信号饱和性的干扰（Wybcrynski *et al.*，1989）。

通过半定量 RT-PCR 和 Real-time qPCR 技术解析了该酯酶基因在不同组织的表达谱。结果表明，*AlucEST*1 在绿盲蝽的触角、头、胸、腹、足、翅各部位都有表达，其中在触角、胸部和腹部的表达量最高，推测该基因可能参与绿盲蝽体内的多种代谢活动，如有毒化学物质和气味分子的降解。

```
1     atg ggg agt tta atc ctg agc agt ctg cag cgg ggt taa cga act cga aag ATG CTG TTG
                                                                        M   L   L
61    GCG GTC GTC TGG ACC GTC GTC GCC GCT GTC GCG GTC GTC GCT GAG CAG CCG GAA GTC GTG
       A   V   V   W   T   V   V   A   A   V   A   V   V   A   E   Q   P   E   V   V
121   ACG ACT TTG GGG ACG ATC AAG GGG TCG ACG ATG GAG TCG CTG AAC GGC AGA ACG ATC TTC
       T   T   L   G   T   I   K   G   S   T   M   E   S   L   N   G   R   T   I   F
181   GCT TTT GAA GGG GTT CCC TAC GCC AAG CCG CCG ATC GGG AAA CAC CGG TTC AAG CAA TCT
       A   F   E   G   V   P   Y   A   K   P   P   I   G   K   H   R   F   K   Q   S
241   GTA CCT GGC ACA GCA TGG GCA GGT GTT CTC AAC GCC ACG AGG ATC CCC AAC ATG TGC ATG
       V   P   G   T   A   W   A   G   V   L   N   A   T   R   I   P   N   M   C   M
301   CAG CTT CCC AAC CAG ATG ACG CTT AAA GAC TTC CCA CTT GAC GTC GCC GGG TCT GAA GAC
       Q   L   P   N   Q   M   T   L   K   D   F   P   L   D   V   A   G   S   E   D
361   TGC TTG TAC ATG AAC ATT TAT ACC ACA AAG CTA CCT GCA GAT CTC CCG GAT GGG ACT CTA
                                                                  GSP1
       C   L   Y   M   N   I   Y   T   T   K   L   P   A   D   L   P   D   G   T   L
421   CAT GAC GTC ATC GTT CAC ATC CAC GGT GGA GAT TTT CAA GTC ATG TCG GGC GAC CTC TGG
       H   D   V   I   V   H   I   H   G   G   D   F   Q   V   M   S   G   D   L   W
481   GGT CCG AGA CAT CTC CTC GAC AGG GAC TTC GTC TAC GTC AAC TTC AAC TAC CGC ATG GGA
       G   P   R   H   L   L   D   R   D   F   V   Y   V   N   F   N   Y   R   M   G
541   GTG CTG GGT TTC CTA AGT TTA GAC GAT AAA ACT TGC CCA GGG AAT AAC GGA CTC AAA GAC
       V   L   G   F   L   S   L   D   D   K   T   C   P   G   N   N   G   L   K   D
601   CAG AAT TTG GCA TTG AAG TGG ATC AAC AAG CAC ATA GCT GCT TTC GGC GGA AAC CCC AAC
       Q   N   L   A   L   K   W   I   N   K   H   I   A   A   F   G   G   N   P   N
661   AGC ATA ACC ATA ACC GGA ATT TCC GCT GGA GGT GCC AGT GTC CAC TAT CAT CTA CTT TCG
       S   I   T   I   T   G   I   S   A   G   G   A   S   V   H   Y   H   L   L   S
721   CCA CTC AGT AAA GGC CTC TTC CAC AAA GCG ATC GCA AAC AGC GGA GCA GTG CTG AAC CCC
       P   L   S   K   G   L   F   H   K   A   I   A   N   S   G   A   V   L   N   P
781   TGG GCT CTG ACC AAG AAA CCC CGT GAG AAA GCT CTG GTG ATC GCC AAC GCC GTA GGA TGT
       W   A   L   T   K   K   P   R   E   K   A   L   V   I   A   N   A   V   G   C
841   GCT TCC AAC GAC TCG ATC CTC ATC CTT GAG TGC TTG AGA GAC AGA CCA GCG GAA CAG TTG
       A   S   N   D   S   I   L   I   L   E   C   L   R   D   R   P   A   E   Q   L
901   GTC TTG TCC GCG AAA TTG CTA GAG GCA TGG GCA GGA CTG CCA ATC GAC ACT ATT GGG CCA
       V   L   S   A   K   L   L   E   A   W   A   G   L   P   I   D   T   I   G   P
961   ATA GTC GAA CAA CCG AGT GCC AAC GCC TTC ATC GAC CAG CAA CCT ATT GAT ATA ATC AAG
       I   V   E   Q   P   S   A   N   A   F   I   D   Q   Q   P   I   D   I   I   K
1021  TCC AGA ACA GTC AAC GAT GTG CCA ATC ATA TTC TCC TAC ACT AAC GAC GAA GGC TCC ATC
       S   R   T   V   N   D   V   P   I   I   F   S   Y   T   N   D   E   G   S   I

1081  TTC GTG ATG AGG GTT CTC ATG GAA GAA AAA TTC AAC CAA GCG TTG CAC GAG AGA TGG AAT
       F   V   M   R   V   L   M   E   E   K   F   N   Q   A   L   H   E   R   W   N
1141  GAC TTG GTG CCC CAC GTT CTG GAG TAC AAT GAC GTC ATG GAC CCT TCG CAT GCA GCT GAA
                              GSP2
       D   L   V   P   H   V   L   E   Y   N   D   V   M   D   P   S   H   A   A   E
1201  ATT GCG TCT GAA ATA CAG AAG TAC TAT TTG GGG GAC AGA AAA TTC ATG GAA GCT CTG CCA
       I   A   S   E   I   Q   K   Y   Y   L   G   D   R   K   F   M   E   A   L   P
1261  GAC TTC GTC AGA AGT GTA AGC GAG CGT TAC TTC GAT AAT GGC ATC CAA GAA GCA GCA ATG
       D   F   V   R   S   V   S   E   R   Y   F   D   N   G   I   Q   E   A   A   M
1321  CTC CAC GCG CAG TAC CAG GCT TCT CCA GTC TAT GCC TAC AGG TTT TCC TAC GCT GGG GAG
       L   H   A   Q   Y   Q   A   S   P   V   Y   A   Y   R   F   S   Y   A   G   E
1381  AAA GGG TTT AAC CCT TTC AAC GAC ATG TTC AAG AAA ATC TAT AAA GGC AAA GCT CCT CAT
       K   G   F   N   P   F   N   D   M   F   K   K   I   Y   K   G   K   A   P   H
1441  GGC TAC GAC GGT CCT TTC TAT TAC TCC ATG GGA CCT CTT TGG GTT CCG CCA ATC CAA AAC
       G   Y   D   G   P   F   Y   Y   S   M   G   P   L   W   V   P   P   I   Q   N
1501  TTC CCT GAA GCA CTT AGA ATG TCA AAA ACC ATG ATC GAC TAC TGG GAG AGC TTC ATC AAA
       F   P   E   A   L   R   M   S   K   T   M   I   D   Y   W   E   S   F   I   K
1561  GGG ACA CCC GTA GCG GCA TGG TCA ACA GTG AAA TCA GGC CTC CCA GAC TGG CAC TTC CTC
       G   T   P   V   A   A   W   S   T   V   K   S   G   L   P   D   W   H   F   L
1621  GAC ATC GTG GGA CCA GAA ACT TCA GGA AAC GTA TTC AAA ACG GAA AAG ACG TTA TCC CTC
       D   I   V   G   P   E   T   S   G   N   V   F   K   T   E   K   T   L   S   L
1681  AAC TTC TGG AAC GGA CTG AAC CTC AAG GAG AAT TCA TTG GAA AGA ATG AAA TTT AGT CAG
       N   F   W   N   G   L   N   L   K   E   N   S   L   E   R   M   K   F   S   Q
1741  CCT CCT GTT CAC AAC GAA TTG TGA ata aaa gcc ttt ttc taa aaa aaa aaa aaa aaa aaa
       P   P   V   H   N   E   L   *
1801  aaa aaa aaa a
```

图 1 绿盲蝽 *AlucEST*1 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *AlucEST*1 in *Apolygus lucorum*

图中阴影部分分别为 GSP1 和 GSP2。GSP1 and GSP2 are shaded in the figure.

昆虫的代谢抗性是昆虫的主要解毒机制，已有研究表明，与杀虫剂代谢相关的解毒酶的解毒能力增强是昆虫对杀虫剂产生抗性的主要原因之一（刘海涛等，2010）。目前在国内外的研究中，对于气味降解酶的鉴定尚无统一的标准。气味降解酶所包含的种类多且在各个昆虫体内的作用复杂，存在广

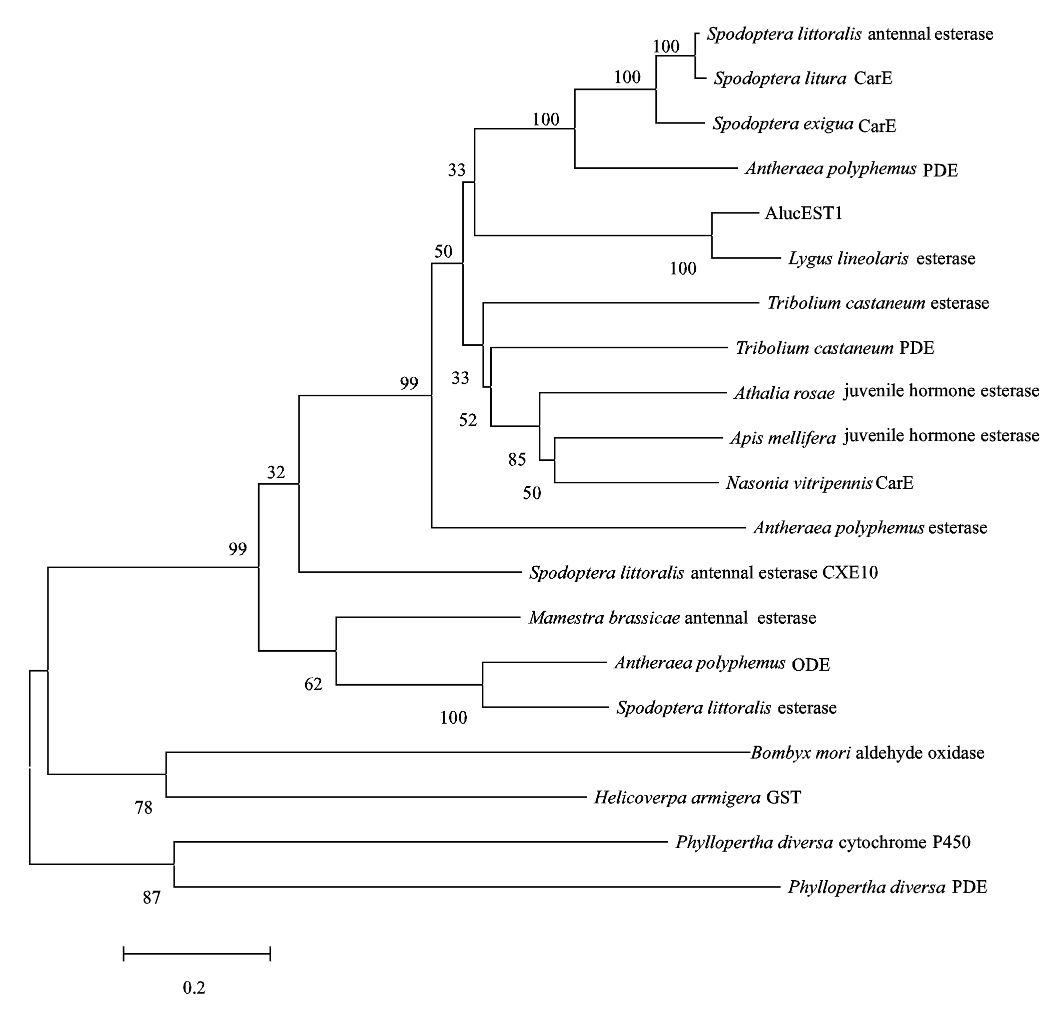


图 2　昆虫酯酶系统发育进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of 21 esterases in distinct insect orders based on amino acid sequences

酯酶及 GenBank 登录号 Esterases and their GenBank accession numbers：*Spodoptera littoralis* antennal esterase：海灰翅夜蛾触角酯酶（FJ652453）；*Spodoptera litura* CarE：斜纹夜蛾羧酸酯酶（HQ116556）；*Spodoptera exigua* CarE：甜菜夜蛾羧酸酯酶（HQ116560）；*Antheraea polyphemus* PDE：多音天蚕蛾信息素降解酶（AY866481）；*Tribolium castaneum* esterase：赤拟谷盗酯酶（NM001170626）；*Tribolium castaneum* PDE：赤拟谷盗属信息素降解酶（XM965803）；*Athalia rosae* juvenile hormone esterase：莱叶蜂保幼激素酯酶（AB208650）；*Apis mellifera* juvenile hormone esterase：意大利蜜蜂保幼激素酯酶（NM_001011563）；*Nasonia vitripennis* CarE：丽蝇蛹集金小蜂羧酸酯酶（NM001172495）；AlucEST1：绿盲蝽酯酶（JQ715614）；*Lygus lineolaris* esterase：牧草盲蝽酯酶（AY538666）；*Antheraea polyphemus* esterase：多音天蚕蛾外皮酯酶（AY091504）；*Mamestra brassicae* antennal esterase：甘蓝夜蛾触角酯酶（AY390258）；*Spodoptera littoralis* esterase：海灰翅夜蛾触角酯酶（DQ680828）；*Antheraea polyphemus* ODE：多音天蚕蛾气味降解酶（AY091503.1）；*Spodoptera littoralis* antennal esterase CXE10：海灰翅夜蛾触角酯酶（FJ652453）；*Bombyx mori* aldehyde oxidase：家蚕醛氧化酶（NM001110342）；*Phyllopertha diversa* cytochrome P450：庭园丽金龟 P450（AY605088）；*Phyllopertha diversa* PDE：庭园丽金龟信息素降解酶（AAX58711）；*Helicoverpa armigera* GST：棉铃虫谷胱甘肽-S-转移酶（AY058242）.

泛和多功能等特点都为研究带来困难。已报道的具有降解作用的酶类在鳞翅目、膜翅目的发现较多，而在半翅目昆虫中报道较少。由此推断，在绿盲蝽体内，该酯酶基因可能是重要的解毒酶基因之一，参与昆虫体内的解毒代谢，并且极有可能与昆虫的抗药性有关。同时，该基因在绿盲蝽触角中也有大量表达，说明该基因可能与嗅觉机制相关，可能参与了气味分子的降解过程，在昆虫的嗅觉通讯行为中发挥重要作用。有研究表明昆虫嗅觉系统中也存在大量的解毒酶，从而维持嗅觉的正常生理功能（杨微等，2011）。实际上，昆虫气味分子均属于化学小分子，在某种程度上也可视作农药成分，所以 *AlucEST*1 在绿盲蝽体内的功能与抗药性相关也不足为奇。本文结果可为研究绿盲蝽嗅觉识别，气味分子的降解以及信号的失活提供重要的参考依据。

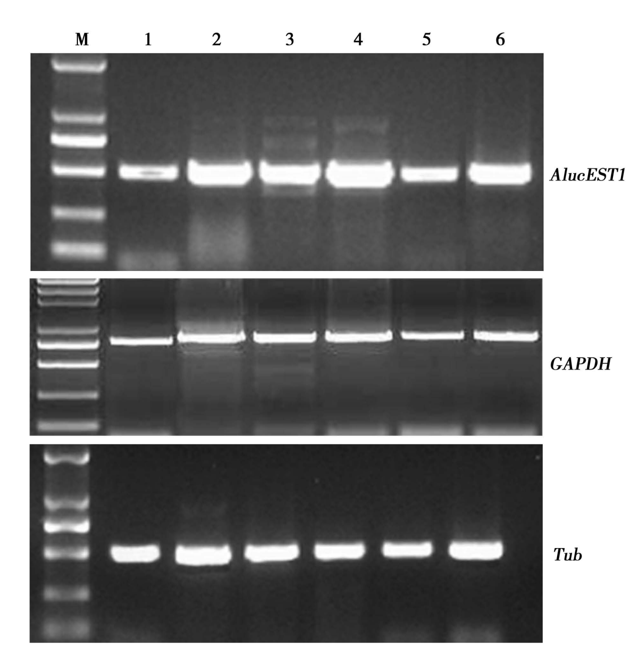


图 3 RT-PCR 分析绿盲蝽不同组织中 *AlucEST*1 基因表达谱
Fig. 3 Expression analysis of *AlucEST*1 in different tissues of *Apolygus lucorum* by RT-PCR
M: DL2000; 1: 触角 Antenna; 2: 头 Head; 3: 胸 Thorax; 4: 腹 Abdomen; 5: 足 Legs; 6: 翅 Wings.

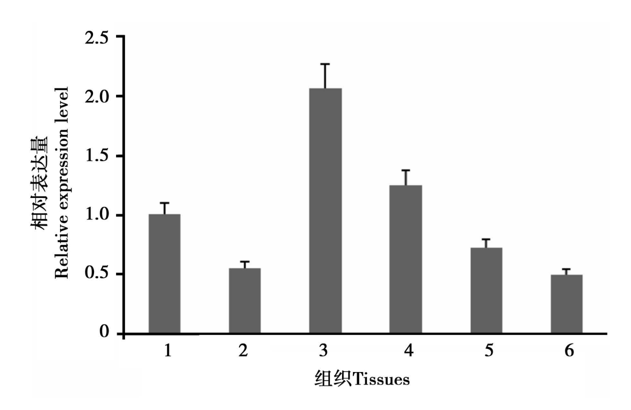


图 4 绿盲蝽酯酶基因在各组织中的表达水平
Fig. 4 Expression levels of *AlucEST*1 in various tissues of *Apolygus lucorum*
1: 触角 Antenna; 2: 头 Head; 3: 胸 Thorax; 4: 腹 Abdomen; 5: 足 Legs; 6: 翅 Wings. 图中数值为 3 次重复的平均值 ± 标准误。Values are mean ± *SE* of three replications.

参考文献 (References)

Durand N, Carot-Sans G, Chertemps T, Bozzolan F, Party V, Renou M, Debernard S, Rosell G, Maïbèche-Coisn M, 2010a. Characterization of an antennal carboxylesterase from the pest moth *Spodoptera littoralis* degrading a host plant odorant. *PLoS ONE*, 5(11): e15026.

Durand N, Carot-Sans G, Chertemps T, Montagné N, Jacquin-Joly E, Debernard S, Maïbèche-Coisn M, 2010b. A diversity of putative carboxylesterases are expressed in the antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Molecular Biology*, 19(1): 87–97.

Ishida Y, Leal WS, 2002. Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkmoth, *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1775–1780.

Ishida Y, Leal WS, 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 14075–14079.

Liu HT, Li B, Zhao GD, Zhang T, Gao RN, Wei ZG, Shen WD, 2010. Sexual differences in main detoxification enzymes and their gene expression in different instars of *Bombyx mori* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 53(5): 479–486. [刘海涛, 李兵, 赵国栋, 张婷, 高瑞娜, 卫正国, 沈卫德, 2010. 家蚕幼虫不同龄期体内主要解毒酶及其基因表达的性别差异. 昆虫学报, 53(5): 479–486]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408.

Lu YH, Wu KM, 2008. Biology and Control of Cotton Mirids. Jindun Publidhing House, Beijing. [陆宴辉, 吴孔明, 2008. 棉花盲蝽象及其防治. 北京: 金盾出版社]

Lu YH, Wu KM, Guo YY, 2007. Flight potential of *Lygus lucorum* (Meyer-Dür) (Heteroptera: Miridae). *Environmental Entomology*, 36: 1007–1013.

Maïbèche-Coisne M, Merlin C, François M-C, Queguiner I, Porcheron P, Jacquin-Joly E, 2004. Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Antheraea polyphemus*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chemical Senses*, 29: 381–390.

Merlin C, Rosell G, Carot-Sans G, François MC, Bozzolan F, Pelletier J, Jacquin-Joly E, Guerrero A, Maïbèche-Coisne M, 2007. Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation. *Insect Molecular Biology*, 16(1): 73–81.

Vogt RG, 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In: Gilbert L, Iatro K, Gill S eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology. Vol. 3. Elsevier Academic Press, London. 753–804.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161–163.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Research advance on molecular mechanism of odors perception in insects. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 12(6): 720–726. [王桂荣, 吴孔明, 郭予元, 2004. 昆虫感受气味物质的分子机制研究进展. 农业生物技术学报, 12(6): 720–726]

Wirth MC, Maite M, George PG, Nicole P, 1990. Esterase A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. *Journal of Medical Entomology*, 27(2): 202–206.

Wu KM, 2007. Environmental impact and risk management strategies of Bt cotton commercialization in China. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 4(2): 93–97.

Wybcrynski R, Reagan J, Lerner MR, 1989. A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *Journal of Neuroscience*, 9(4): 1341 - l353.

Yang W, Qi DW, Yu QY, Zhang Z, 2011. Cloning, sequence analysis and expression of carboxylesterase gene *Bmae*35 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 54(6): 634 - 641. [杨微，齐登伟，余泉友，张泽，2011. 家蚕羧酸酯酶基因 *Bmae*35 的克隆、序列分析及表达. 昆虫学报，54(6): 634 - 641]

Zhang X, Guo W, Li GX, Song SS, 2008. Cloning, expression and sequence analysis of carboxylesterase gene from *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(7): 681 - 688. [张霞，郭巍，李国勋，宋水山，2008. 甜菜夜蛾羧酸酯酶基因 cDNA 的克隆、表达及序列分析. 昆虫学报，51(7): 681 - 688]

Zhu YC, Snodgrassa GL, Chen MS, 2004. Enhanced esterase gene expression and activity in a malathion-resistant strain of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(11): 1175 - 1186.

（责任编辑：赵利辉）